

- 8 MARS 2000

09/914455

REC'D 27 MAR 2000

WIPO

PCT



# BREVET D'INVENTION

ESU

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 MARS 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**This Page Blank (uspto)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES **08.103/99**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 02819**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **08 MARS 1999**

**2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle**

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale  
☐ brevet d'invention

**Établissement du rapport de recherche**

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

**Titre de l'invention (200 caractères maximum)**

**PROCEDE DE REALISATION D'UNE MATRICE DE SEQUENCES DE MOLECULES  
CHIMIQUES OU BIOLOGIQUES POUR DISPOSITIF D'ANALYSE CHIMIQUE OU  
BIOLOGIQUE.**

**3 DEMANDEUR (S) n° SIREN**

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
Etablissement de Caractère Scientifique,  
Technique et Industriel**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

Pays

**31, 33 rue de la Fédération 75015 PARIS**

**France**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

**4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs**

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

**5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

**6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

**7 DIVISIONS**

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

**8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

(nom et qualité du demandeur)

**M. DES TERMES  
422-5/S002**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

B 13196.3/MDT

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

990 2819

TITRE DE L'INVENTION :

PROCÉDE DE RÉALISATION D'UNE MATRICE DE SÉQUENCES DE MOLECULES  
CHIMIQUES OU BIOLOGIQUES POUR DISPOSITIF D'ANALYSE CHIMIQUE OU  
BIOLOGIQUE.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

M. DES TERMES  
c/o BREVATOME  
25 rue de Ponthieu  
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ROSILIO Charles

16, allée de la Pommeraie  
91190 GIF-SUR-YVETTE

VINET Françoise

22, Bld Edouard Rey  
38000 GRENOBLE

VAUCHIER Claude

2, Impasse Jacques-Henri LARTIGUE  
38120 SAINT-EGREVE

CLERC Jean Frédéric

8, allée Montpertuis  
38120 FONTANIL-CORNILLON

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS LE 8 MARS 1999

  
M. DES TERMES  
422-5/8002

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
PM				27/8/93	J P M - 31 AOUT 1993

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROCEDE DE REALISATION D'UNE MATRICE DE SEQUENCES DE  
MOLECULES CHIMIQUES OU BIOLOGIQUES POUR DISPOSITIF  
D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE.

DESCRIPTION

5    **Domaine technique**

La présente invention a pour objet un procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques pour dispositif d'analyse chimique ou biologique.

10    Les molécules chimiques ou biologiques peuvent être en particulier des aminoacides ou des nucléotides, les séquences étant alors des peptides ou des oligonucléotides.

Elle s'applique en particulier à la  
15    réalisation d'une matrice de sondes oligonucléotidiques.

**État de la technique antérieure**

De nouveaux systèmes ou dispositifs  
20    d'analyse chimique ou biologique sont utilisés pour le séquençage et l'étude de l'expression des gènes. Ils sont constitués d'un ensemble de sondes moléculaires (oligonucléotides) fixées sur la surface miniaturisée d'un substrat afin de réaliser une biopuce ou puce à  
25    ADN.

Au cours de l'analyse d'un échantillon, les acides nucléiques cibles extraits sont marqués et déposés sur la matrice de sondes. L'hybridation

(appariement entre les brins complémentaires de la double hélice d'ADN) entre les sondes et les cibles marquées permet de repérer et d'identifier les séquences de l'échantillon d'ADN.

5 De nombreux procédés de réalisation ont été décrits et développés pour améliorer la miniaturisation et la capacité de densité de sites d'analyse sur la puce.

10 Différentes techniques de greffage et d'immobilisation des sondes (par liaison covalente ou électrostatique) sur différents substrats (silicium, verre, polymère, électrodes en or ...) ont fait l'objet de recherches et de développements industriels.

Les matrices de sondes sont alors réalisées  
15 - soit par l'immobilisation d'oligonucléotides présynthétisés par greffage de ceux-ci sur un substrat fonctionnalisé ou sur un polymère conducteur,

- soit par synthèse in situ des oligonucléotides sondes sur le substrat.

20 Les procédés de synthèse in situ utilisés jusqu'à présent font appel à deux modes d'adressage différents des sites, qui sont soit l'adressage manuel par microrobot comme il est décrit dans US-A-5 474 796 [1], et l'adressage photochimique comme  
25 il décrit dans WO-A-97/39 151 [2].

Dans le document US-A-5 474 796 [1], on forme tout d'abord sur le substrat des sites fonctionnalisés en utilisant des photorésists ou des masques pour définir les différents sites du substrat,  
30 puis on forme les séquences d'oligonucléotides sur les sites fonctionnalisés par injection des réactifs sur les sites voulus au moyen d'une pompe piézo-électrique.

Dans le document WO-A-97/39151 [2], on soumet tout d'abord le substrat à un traitement pour le munir de groupes fonctionnels protégés avec un groupe protecteur photolabile, puis on déprotège certains groupes fonctionnels du substrat par irradiation sélective à travers un masque pour définir les sites et on fait réagir ensuite sur ces sites un nucléotide pour construire la séquence voulue.

Dans les deux cas, la synthèse in situ met en jeu les réactions classiques de couplage par l'intermédiaire des phosphoramidites, des phosphites ou des phosphonates, pour la condensation successive des nucléotides judicieusement protégés. Le cycle de synthèse comprend les étapes de déprotection, couplage, blocage et oxydation, et permet de faire croître l'oligonucléotide à partir de la surface de chaque site.

Dans l'adressage photochimique, on réalise les étapes de déprotection des nucléotides par la lumière. L'adressage des sites se fait par une étape de lithographie (insolation au travers d'un masque). Le groupement protecteur photolabile est éliminé par la lumière, permettant ainsi de réaliser le couplage ultérieur par trempage du substrat dans une solution d'un nucléotide activé (par exemple d'un phosphoramidite), en présence d'un catalyseur, par exemple le tétrazole.

Ce procédé de synthèse combinatoire dirigé par la lumière nécessite la réalisation d'un nombre de masques égal au nombre de nucléotides qui composent l'oligonucléotide et constitue une opération coûteuse et fastidieuse. Si ce procédé présente l'avantage de conduire à des puces de très haute densité (résolution



du procédé de photolithographie), le rendement des réactions photochimiques (élimination des groupements photolabiles) n'est par contre jamais de 100 %, et on ne peut être sûr de la pureté de la séquence  
5 oligonucléotidique réalisée sur la puce.

Dans le cas du document US-A-5 474 796 [1], qui utilise la technique d'impression par jets (têtes piézo-électriques) pour distribuer sur les différents sites de la puce, les 4 nucléotides activés de base de  
10 l'ADN ainsi que les réactifs de couplage, la synthèse en phase solide sur des sites d'une centaine de  $\mu\text{m}^2$ , avec des quantités de réactifs de l'ordre du nanolitre, exige des conditions d'atmosphère contrôlée (sensibilité à l'humidité et l'oxygène) difficiles à  
15 réaliser dans l'environnement d'un microdispenseur et de ses équipements associés.

La présente invention a précisément pour objet un procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques, par  
20 exemple d'oligonucléotide, qui permet de pallier les inconvénients des deux procédés décrits ci-dessus.

#### Exposé de l'invention

Le procédé de l'invention utilise un dépôt localisé sélectif d'un matériau protecteur sur des  
25 sites choisis. Le matériau protecteur est capable de protéger momentanément les sites choisis d'une réaction chimique conduisant au couplage avec la molécule de l'enchaînement suivant. Cet adressage mécanique par microdéposition sur les sites choisis, remplace  
30 l'adressage photochimique ou électrique utilisé dans les autres procédés de synthèse combinatoire, par

exemple pour la réalisation de sondes d'oligonucléotides.

Selon l'invention le procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques formées d'enchaînements différents de molécules M1, M2, ... Mn, sur différents sites d'un substrat, comprend les étapes suivantes :

- a) masquage de certains sites choisis par dépôt sur leur surface d'un matériau de protection,
- 10 b) réalisation d'au moins une réaction chimique sur les sites non masqués dans l'étape a) pour coupler avec au moins une molécule choisie parmi les molécules M1, M2, ... et Mn,
- c) élimination du matériau de protection sur les 15 sites masqués dans l'étape a),
- d) dépôt d'un matériau de protection sur d'autres sites choisis parmi les sites ayant subi l'étape b) et éventuellement une partie des sites qui ont été masqués dans l'étape a),
- 20 e) réalisation d'au moins une réaction chimique sur les sites non recouverts de matériau de protection dans l'étape d), pour les coupler avec au moins une molécule choisie parmi les molécules M1, M2, ... Mn,
- f) élimination du matériau de protection sur les 25 sites choisis dans l'étape d), et
- g) réalisation à nouveau des étapes d), e) et f) pour obtenir les séquences d'enchaînement voulu sur chacun des différents sites.

Selon un mode particulier de réalisation du procédé de l'invention, celui comprend les étapes 30 suivantes :

- 1) fonctionnalisation des sites du substrat par des groupes fonctionnels capables de former une liaison

covalente avec les molécules M1, M2, ... Mn, chaque groupe fonctionnel étant protégé par un groupe protecteur labile en milieu acide ou basique ; ces groupements fonctionnels sont par exemple OH ou NH<sub>2</sub> ou  
5 peuvent être remplacés par des polymères portant des groupes OH ou NH<sub>2</sub> ;

2) dépôt d'un matériau de protection sur au moins l'un des sites fonctionnalisés du substrat ;

3) élimination des groupes protecteurs des groupes  
10 fonctionnels sur les sites du substrat non recouverts du matériau de protection ;

4) couplage d'une première molécule M1 sur les groupes fonctionnels déprotégés des sites non recouverts de matériau de protection, par immersion du  
15 substrat dans une solution de réactif approprié comprenant la molécule M1 qui comporte deux groupes fonctionnels réactifs dont l'un est protégé par un groupe protecteur ;

5) élimination du matériau de protection sur les  
20 sites recouverts de ce matériau ;

6) dépôt de matériau de protection sur les sites comportant la molécule M1 ainsi qu'éventuellement sur d'autres sites du substrat non couplés à la molécule M1 ;

25 7) élimination des groupes protecteurs des groupes fonctionnels sur les sites du substrat non recouverts du matériau de protection ;

8) couplage d'une molécule M2, ... ou Mn sur les groupes fonctionnels déprotégés des sites non recouverts du matériau de protection, par immersion du  
30 substrat dans une solution de réactif approprié comprenant la molécule M2, ... Mn qui comporte deux

groupes fonctionnels réactifs dont l'un est protégé par un groupe protecteur ;

9) élimination du matériau de protection sur les sites recouverts de ce matériau ; et

5 10) réalisation à nouveau des étapes 6) à 9) au moins une fois pour coupler ensuite les groupes fonctionnels de chaque site, puis les groupes fonctionnels des molécules M1, M2, ... Mn couplées aux sites, avec des molécules M1, M2, ... Mn et obtenir les  
10 séquences d'enchaînement voulues sur les différents sites.

Dans ce mode particulier de réalisation, on utilise un substrat fonctionnalisé dont les groupes fonctionnels sont protégés par un groupe protecteur  
15 labile. Ceci permet d'effectuer les étapes b) et e) du procédé en faisant réagir les groupes fonctionnels, après élimination des groupes protecteurs, avec une solution de réactifs permettant d'assurer le couplage des molécules M1, M2, ... Mn.

20 Ces sites peuvent être des parties définies sur un substrat plan ou des microcuvettes usinées directement sur le substrat ou définies par un relief, de préférence en polymère, déposé sur le substrat, ou encore ces sites peuvent être des plots constitués d'un  
25 matériau (de préférence un polymère) déposé sur le substrat.

Ce procédé permet ainsi de réaliser un dispositif d'analyse biologique à grande capacité, par synthèse chimique in situ d'une matrice de séquences de  
30 molécules chimiques telles que des sondes d'oligonucléotides.

De préférence selon l'invention, le procédé comprend une étape complémentaire de blocage des

groupes fonctionnels qui n'auraient pas été couplés avec les molécules M1, M2, ... Mn lors des étapes 4) et 8), cette étape étant réalisée après les étapes 4) et 8) et avant les étapes 5) et 9), et ce blocage  
5 étant effectué par mise en place d'un groupe bloquant non labile dans les conditions d'élimination des groupes protecteurs des sites fonctionnalisés et des molécules M1, M2, ... Mn.

Dans le cas où les molécules M1, M2, ... Mn  
10 sont des nucléotides du type phosphoramidite, les étapes de couplages 4) et 8) sont généralement suivies par une étape d'oxydation pour oxyder le phosphore trivalent en phosphore pentavalent plus stable.

Dans le procédé de l'invention, les étapes  
15 de déprotection, de couplage, d'élimination du matériau de protection et éventuellement d'oxydation, sont réalisées par trempage du substrat dans les bains de réactifs appropriés. Seule l'étape d'adressage des sites, qui correspond à une protection sélective des  
20 sites choisis par le matériau de protection est effectuée à l'aide de techniques de microdéposition. Elle peut être effectuée par micropipetage avec des microrobots ou par des méthodes d'impression par jets.

Avantageusement, le matériau de protection  
25 est déposé sur les sites voulus à l'état liquide par adressage mécanique au moyen d'un microdispenseur de type par exemple robot de micropipetage ou d'impression par jets.

Ce matériau peut être en solution dans un  
30 solvant et, dans ce cas, on élimine ensuite le solvant par chauffage du substrat à une température de 50 à 100°C, avant d'effectuer l'étape b) ou e) ou l'étape 3) ou 7).

Selon l'invention, les molécules M1, M2, ... Mn peuvent être de différents types. A titre d'exemple, il peut s'agir d'acides aminés naturels ou synthétiques L- ou D-, de nucléotides (ARN ou ADN), de pentose ou d'hexose. Dans le cas des acides aminés le  
5 nombre de molécules M1, M2,... Mn peut être important. Dans le cas des nucléotides, le nombre de molécules est plus limité puisqu'il inclut A, T (ou U), G et C.

Dans ce cas, les nucléotides peuvent être  
10 sous forme de phosphoramidites, de phosphotriesters ou de H-phosphonates selon le type de synthèse nucléotidique mise en oeuvre. Ces molécules comportent deux fonctions réactives (hydroxyle et fonction avec phosphore) dont l'une, la fonction hydroxyle, est  
15 protégée par un groupe protecteur, de préférence identique au groupe protecteur des sites fonctionnalisés.

Dans le procédé de l'invention, le choix du matériau de protection est très important car celui-ci  
20 doit présenter un certain nombre de propriétés. En effet, ce matériau doit être inerte lors des étapes d'élimination des groupes protecteurs, d'élimination des groupes fonctionnels, et de couplage des molécules M1, M2, ... Mn sur le substrat. Ainsi, il ne doit pas  
25 être soluble dans les différents solvants utilisés lors de ces étapes du procédé de l'invention. Ces solvants sont par exemple le chlorure de méthylène, l'acétonitrile et le tétrahydrofuranne. Par ailleurs, il ne doit pas réagir avec les réactifs utilisés tels  
30 que l'acide trichloroacétique, la diméthyl aminopyridine DMPA etc. De plus, la perméabilité du matériau à ces solvants doit être nulle.

Ainsi, il est préférable que le matériau de protection ne comporte pas de fonctions avec des hydrogènes libres du type OH, NH<sub>2</sub> ou COOH qui seraient capables de se coupler avec les molécules M1, M2, ... Mn, par exemple les nucléotides, au cours de l'étape de couplage pour éviter de consommer inutilement des réactifs qui seront éliminés avec le matériau de protection lors des étapes 5) et 9).

Il doit pouvoir être éliminé par un solvant inerte vis-à-vis des nucléotides et il doit de plus présenter des propriétés physico-chimiques telles qu'une viscosité et une tension superficielle, permettant son dépôt sur le site par un procédé par jets.

Différents matériaux peuvent être utilisés pour obtenir cette protection en étant déposés par la technique de l'impression par jets. On connaît par exemple des polymères comme le polyvinylcarbazole, le polycarbonate et les polyvinylalcools comme le PVA, des colorants, des laques ou encres d'argent ou de carbone, des enzymes, des réactifs et des matériaux biomédicaux, du glucose, des macromolécules biologiques, des protéines etc., et des liquides pour la soudure et le scellement tels que des colles, des résines et des vernis. On peut encore utiliser des cires, des paraffines ou d'autres polymères.

Lorsque les groupes protecteurs sont constitués par des groupements trityle, on utilise généralement pour leur élimination en milieu acide un solvant tel que le dichlorométhane. De ce fait, les polyvinylcarbazoles et les polycarbonates ne peuvent être utilisés car ils sont solubles dans le dichlorométhane. En revanche, si l'on utilisait

d'autres solvants que le dichlorométane pour la détritylation, on pourrait employer ces polymères à condition bien entendu qu'ils ne soient pas solubles dans ces autres solvants.

5                   Selon l'invention, on utilise de préférence un polymère comme matériau de protection et, parmi les polymères, on préfère les polymères de type polyimide tels que la résine XU218 de Ciba Geigy, la résine PIQ d'Hitachi et le polymère Ultradel 1414, 1608, 3112,  
10 4012 commercialisé par Amocco et le PVA commercialisé entre autres par Aldrich.

Le procédé de l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés de l'art antérieur.

15                   En effet, par rapport au procédé de la référence [2] qui utilise un adressage photochimique pour la synthèse in situ, il évite la nécessité de réaliser des photomasques, c'est-à-dire des opérations longues et coûteuses, car il s'agit de réaliser un  
20 nombre de masques égal au nombre de molécules M1, M2, ... Mn qui constituent les séquences. De plus, dans le cas de l'adressage photochimique, la déprotection n'est pas totale et plus la séquence est longue, plus la probabilité d'obtenir la séquence voulue est faible.  
25 De ce fait, on constitue sur le substrat des séquences redondantes, ce qui n'est pas nécessaire dans l'invention où la déprotection est totale.

Par rapport au procédé de la référence [1], le procédé de l'invention est plus facile à mettre en  
30 oeuvre car les réactions de couplage peuvent être effectuées avec un excès de réactifs alors que, selon la référence [2], les réactions de couplages sont effectuées avec quelques nl de réactifs directement sur



le site à modifier dans des conditions particulières, soit en atmosphère d'azote ou d'argon.

Dans le procédé de l'invention, l'impression par jets du matériau de protection sur les sites voulus ne nécessite pas de précautions particulières, la seule condition étant que la gouttelette du matériau recouvre le site à protéger.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre illustratif et non limitatif en référence aux dessins annexés.

#### Brève description des dessins

Les figures 1A à 1G illustrent les différentes étapes du procédé de l'invention pour la réalisation d'une matrice de sondes d'oligonucléotides.

#### Exposé détaillé des modes de réalisation

Pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, on part d'un substrat comportant des sites qui sont fonctionnalisés par des groupes fonctionnels capables de former une liaison covalente avec les molécules M1, M2, ... Mn de la séquence à réaliser.

Sur la figure 1A, on voit le substrat 1 muni des sites 3 formés par des microcuvettes. Bien entendu ces sites pourraient être constitués simplement par des zones planes ou des plots en relief. Le substrat peut être un substrat de silicium ou de verre et les sites 3 sont fonctionnalisés par des groupes fonctionnels hydrophiles 5 tels que des groupes

hydroxyles qui sont protégés par des groupes protecteurs 7. Ces groupes protecteurs peuvent être des groupes diméthoxytrityle, habituellement utilisés en synthèse oligonucléotidique.

5 Les sites d'analyses peuvent être définis au préalable par lithographie et gravure chimique sur un substrat de silicium ou de verre.

Lorsque le substrat est une plaquette en silicium, la fonctionnalisation des sites peut être effectuée de la façon suivante.

10 La surface de la plaquette en silicium est tout d'abord oxydée en  $\text{SiO}_2$  par voie thermique, et activée par nettoyage oxydant en  $\text{Si-OH}$ . Ensuite, on procède à une fonctionnalisation des sites par traitement avec un agent de silanisation

15 fonctionnalisé, par exemple un silane comportant un groupement N(bis-hydroxyméthyle), protégé par un groupe tel que le diméthoxytrityle.

Tous les sites 3 du substrat sont fonctionnalisés par ces groupements hydroxyle 5

20 protégés par les groupes diméthoxytrityle DMT protecteurs 7.

On réalise ensuite l'étape 2) de dépôt d'un matériau de protection 9 sur au moins l'un des sites fonctionnalisés de la plaquette, à l'aide d'une

25 micropipette 11 telle qu'un robot dispenseur ou par impression par jets, comme représenté sur la figure 1A.

Sur la figure 1B, on a représenté l'étape 3) suivante qui consiste à éliminer les groupes protecteurs 7 des groupes fonctionnels 5 sur les sites

30 3 de la plaquette non recouverts du matériau de protection 9. On obtient ainsi une plaquette dont les sites 3 non protégés par le matériau de protection 9,

comportent des groupes fonctionnels hydroxyle 5 déprotégés. Cette étape peut être réalisée en trempant la plaquette dans une solution acide, par exemple une solution d'acide trichloroacétique dans du dichlorométhane  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , pour éliminer les groupes trityle de la fonctionnalisation de la surface des sites non protégés.

Sur la figure 1C, on a représenté l'étape suivante 4) de couplage d'une molécule M1 par réaction avec les groupes fonctionnels hydroxyle 5 sur les sites 3 non protégés par le matériau de protection 9. Dans le cas où l'on veut réaliser une matrice de sonde oligonucléotidiques, les molécules M1 sont constitués par des nucléotides tels que des phosphoramidites, des phosphonates ou des phosphites selon le mode de synthèse utilisé pour la fabrication de la sonde. Dans cette étape, on réalise le couplage du premier nucléotide M1 (phosphoramidite) avec les groupes hydroxyle 5 en immergeant la plaquette dans une solution du nucléotide M1 activé dans l'acétonitrile en présence de tétrazole. On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 1C.

Sur la figure 1D, on a représenté l'étape suivante, selon laquelle on bloque les groupes hydroxyle libres restants qui n'auraient pas réagi avec la molécule M1, afin qu'ils ne puissent réagir ensuite avec les autres nucléotides utilisés pour les différents couplages successifs. Cette réaction peut être effectuée par mise en place d'un groupe bloquant 11, par exemple par trempage de la plaquette dans une solution de diméthylaminopyridine DMAP dans du tétrahydrofurane THF.

Dans le cas de la fabrication d'une séquence oligonucléotidique par la méthode utilisant des phosphoramidites, on procède ensuite à une oxydation du phosphore trivalent introduit lors du couplage de l'étape précédente (figure 1C), en phosphore pentavalent plus stable. Ceci peut être réalisé par trempage de la plaquette dans une solution oxydante d'iode dans un mélange d'eau, de pyridine et de tétrahydrofuranne THF.

Après cette étape d'oxydation, on réalise l'étape suivante 5) d'élimination du matériau de protection 9 sur les sites non modifiés. On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 1E. Cette élimination du matériau protecteur 9 peut être réalisée par dissolution dans un solvant approprié en trempant la plaquette dans ce solvant.

Ainsi, mis à part l'étape de dépôt du matériau de protection, les étapes du procédé de l'invention sont réalisées par trempage de la plaquette dans les réactifs et solvants appropriés, suivi de rinçages dans différents solvants, si nécessaire. Ces opérations peuvent se faire dans des récipients avec atmosphère contrôlée. De plus, les réactifs utilisés sont en grand excès par rapport aux molécules sur le substrat solide, ce qui présente l'avantage d'obtenir des réactions avec un taux de conversion pratiquement de 100 %, ce qui n'était pas le cas avec le procédé de la référence [1] où les réactions sont effectuées par micropipetage des réactifs sur les sites choisis.

Après cette première étape de modification des sites choisis par le nucléotide M1, on peut modifier d'autres sites avec une molécule M2, ... ou Mn. Dans ce cas, on procède tout d'abord à une

protection des sites déjà modifiés par le matériau de protection 9. On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 1F. Bien évidemment, d'autres sites du substrat peuvent être également recouverts du matériau de protection 9 même s'ils n'ont pas été modifiés dans les étapes précédentes par la molécule M1. Après cette opération, on élimine alors les groupes protecteurs 7 des groupes fonctionnels hydrophiles 5 des sites non recouverts du matériau de protection 9, puis on couple sur ces groupes fonctionnels 5 un autre nucléotide M2 en opérant de la même façon que précédemment (figures 1B et 1C). La figure 1G illustre la structure obtenue. Après cette opération, on peut procéder au blocage des groupes hydroxyle n'ayant pas réagi, puis à une oxydation du phosphore trivalent en phosphore pentavalent, et à l'élimination du matériau protecteur 9 sur les sites non modifiés par la molécules M2.

On réalise ensuite de nouveau ces différentes opérations sur les sites choisis pour obtenir l'enchaînement voulu de molécule M1, M2, ... Mn, soit des oligonucléotides d'enchaînements différents sur des sites différents du substrat 1.

A titre d'exemple, on a réalisé une matrice de sondes oligonucléotidiques sur un substrat en silicium comportant des microcuvettes de 100 x 100 x 30  $\mu$ m gravées dans le silicium. La fonctionnalisation des microcuvettes a été effectuée avec un agent de silanisation constitué par du N-N(bis-hydroxyéthyl aminopropyltriméthoxy silane) dont les groupements OH sont protégés par tout groupement labile en milieu acide, par exemple par un groupe diméthoxytrityle DMT ou monométhoxytrityle MMT.

Le matériau de protection utilisé était un polymère de type polyimide tel que la résine XU218 de Ciba Geigy. Il a été déposé sur les sites choisis par microdispenseur à tête d'impression piézo-électrique.

5 Ce polymère est soluble dans l'anisole et environ 1 nl de la solution de ce polymère dans l'anisole est déposé par jets dans les microcuvettes que l'on veut sélectivement protéger. On réalise ensuite un post-recuit à 100°C d'une durée de 1 minute, sur une plaque

10 chaude pour éliminer le solvant. Ensuite, on immerge la plaquette de silicium dans une solution d'acide trichloroacétique dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pour éliminer les groupements trityle de la surface et permettre le couplage ultérieur des groupes hydroxyles avec un

15 premier nucléotide, puis on effectue un rinçage dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Après cette opération, on couple le premier nucléotide par trempage dans un bain comprenant le nucléotide portant une fonction phosphoramidite en 3' et une fonction OH protégée par le groupe

20 diméthoxytrityle en 5', un solvant constitué par de l'acétonitrile sec, et du tétrazole, et on immerge la plaquette pendant 5 minutes dans la solution, puis on la rince à l'acétonitrile. Le blocage des groupes hydroxyle n'ayant pas réagi est effectué au moyen d'une

25 solution de diméthylaminopyridine DMAP dans du THF et de la lutidine (6 : 90 : 10) pendant 2 minutes. On immerge ensuite la plaquette dans le bain d'oxydation constitué par une solution d'iode dans du THF, puis on rince dans du dichlorométhane et de l'acétonitrile. On élimine

30 ensuite le polymère de protection par dissolution dans l'anisole, puis on sèche.

On procède alors au dépôt sélectif de polyimide dans les microcuvettes choisies à l'aide du

micro dispenseur de nanogouttes, et on recommence un cycle de couplage avec un second nucléotide et ainsi de suite jusqu'à l'obtention des sondes voulues sur les sites voulus du substrat.

5

#### Références citées

[1] : US-A-5 474 796

10 [2] : WO-A-97/39 151

## REVENDICATIONS

1. Procédé de réalisation d'une matrice de séquences de molécules chimiques ou biologiques formées d'enchaînements différents de molécules M1, M2, ... Mn, sur différents sites d'un substrat, comprenant les étapes suivantes :

a) masquage de certains sites choisis par dépôt sur leur surface d'un matériau de protection,

b) réalisation d'au moins une réaction chimique sur les sites non masqués dans l'étape a) pour coupler avec au moins une molécule choisie parmi les molécules M1, M2, ... et Mn,

c) élimination du matériau de protection sur les sites masqués dans l'étape a),

d) dépôt d'un matériau de protection sur d'autres sites choisis parmi les sites ayant subi l'étape b) et éventuellement une partie des sites qui ont été masqués dans l'étape a),

e) réalisation d'au moins une réaction chimique sur les sites non recouverts de matériau de protection dans l'étape d), pour les coupler avec au moins une molécule choisie parmi les molécules M1, M2, ... Mn,

f) élimination du matériau de protection sur les sites choisis dans l'étape d), et

g) réalisation à nouveau des étapes d), e) et f) pour obtenir les séquences d'enchaînement voulu sur chacun des différents sites.

2. Procédé selon la revendication 1, qui comprend les étapes suivantes :

1) fonctionnalisation des sites du substrat par des groupes fonctionnels capables de former une liaison covalente avec les molécules M1, M2, ... Mn, chaque



groupe fonctionnel étant protégé par un groupe protecteur labile en milieu acide ou basique ;

2) dépôt d'un matériau de protection sur au moins l'un des sites fonctionnalisés du substrat ;

5        3) élimination des groupes protecteurs des groupes fonctionnels sur les sites du substrat non recouverts du matériau de protection ;

4) couplage d'une première molécule M1 sur les groupes fonctionnels déprotégés des sites non  
10 recouverts de matériau de protection, par immersion du substrat dans une solution de réactif approprié comprenant la molécules M1 qui comporte deux groupes fonctionnels réactifs dont l'un est protégé par un groupe protecteur ;

15        5) élimination du matériau de protection sur les sites recouverts de ce matériau ;

6) dépôt de matériau de protection sur les sites comportant la molécule M1 ainsi qu'éventuellement sur d'autres sites du substrat non couplés à la molécule  
20 M1 ;

7) élimination des groupes protecteurs des groupes fonctionnels sur les sites du substrat non recouverts du matériau de protection ;

8) couplage d'une molécule M2, ... ou Mn sur les  
25 groupes fonctionnels déprotégés des sites non recouverts du matériau de protection, par immersion du substrat dans une solution de réactif approprié comprenant la molécule M2, ... ou Mn qui comporte deux groupes fonctionnels réactifs dont l'un est protégé par  
30 un groupe protecteur ;

9) élimination du matériau de protection sur les sites recouverts de ce matériau ; et

10) réalisation à nouveau des étapes 6) à 9) au moins une fois pour coupler ensuite les groupes fonctionnels de chaque site, puis les groupes fonctionnels des molécules M1, M2, ... Mn couplées aux sites, avec des molécules M1, M2, ... Mn et obtenir les séquences d'enchaînement voulues sur les différentes sites.

3. Procédé selon la revendication 2, qui comprend une étape complémentaire de blocage des groupes fonctionnels qui n'auraient pas été couplés avec les molécules M1, M2, ... Mn lors des étapes 4) et 8), cette étape étant réalisée après les étapes 4) et 8) et avant les étapes 5) et 9), et ce blocage étant effectué par mise en place d'un groupe bloquant non labile dans les conditions d'élimination des groupes protecteurs des sites fonctionnalisés et des molécules M1, M2, ... Mn.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le matériau de protection est déposé sur les sites voulus à l'état liquide par adressage mécanique au moyen d'un microdispenseur.

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel le matériau étant en solution dans un solvant, on élimine ensuite le solvant par chauffage du substrat à une température de 50 à 100°C avant d'effectuer l'étape b) ou e), ou l'étape 3) ou 7).

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel les séquences de molécules sont des séquences de nucléotides.

7. Procédé selon la revendication 2, dans lequel les séquences de molécules sont des séquences de nucléotides et les groupes fonctionnels du substrat

sont des groupes hydroxyle ou  $\text{NH}_2$  ou des polymères portant ces groupes.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel les groupes protecteurs sont des groupes diméthoxytrityle.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 et 8, dans lequel la solution de réactif utilisée dans les étapes de couplage 4) et 8) comprend de l'acétonitrile et du tétrazole.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le matériau de protection est choisi parmi les polymères, les colorants, les laques ou encres d'argent ou de carbone, les enzymes, les réactifs et matériaux biomédicaux, le glucose, les macromolécules biologiques, les protéines, les liquides de soudure et de scellement, les cires et les paraffines.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le matériau de protection est un polyimide ou un alcool polyvinylique.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel on élimine le polyimide par dissolution dans l'anisole.

13. Procédé selon les revendications 3 et 7, dans lequel on bloque les groupes hydroxyle non couplés aux molécules  $\text{M}_1, \text{M}_2, \dots, \text{M}_n$  par réaction avec une solution de diméthylaminopyridine DMAP dans du tétrahydrofur et de la lutidine.

30

d'autres solvants que le dichlorométane pour la détritylation, on pourrait employer ces polymères à condition bien entendu qu'ils ne soient pas solubles dans ces autres solvants.

5            Selon l'invention, on utilise de préférence un polymère comme matériau de protection et, parmi les polymères, on préfère les polymères de type polyimide tels que la résine XU218 de Ciba Geigy, la résine PIQ d'Hitachi et le polymère Ultradel 1414, 1608, 3112, 4012 commercialisé  
10 par Amocco et le PVA commercialisé entre autres par Aldrich.

Lorsque le matériau de protection est un polyimide, on peut éliminer celui-ci par dissolution dans l'anisole.

15            Le procédé de l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés de l'art antérieur.

En effet, par rapport au procédé de la référence [2] qui utilise un adressage photochimique pour la synthèse in situ, il évite la nécessité de réaliser des photomasques, c'est-à-dire des opérations  
20 longues et coûteuses, car il s'agit de réaliser un nombre de masques égal au nombre de molécules M1, M2, ... Mn qui constituent les séquences. De plus, dans le cas de l'adressage photochimique, la déprotection n'est pas totale et plus la séquence est longue, plus  
25 la probabilité d'obtenir la séquence voulue est faible. De ce fait, on constitue sur le substrat des séquences redondantes, ce qui n'est pas nécessaire dans l'invention où la déprotection est totale.

30            Par rapport au procédé de la référence [1], le procédé de l'invention est plus facile à mettre en oeuvre car les réactions de couplage peuvent être effectuées avec un excès de réactifs alors que, selon la référence [2], les réactions de couplages sont effectuées avec quelques nl de réactifs directement sur

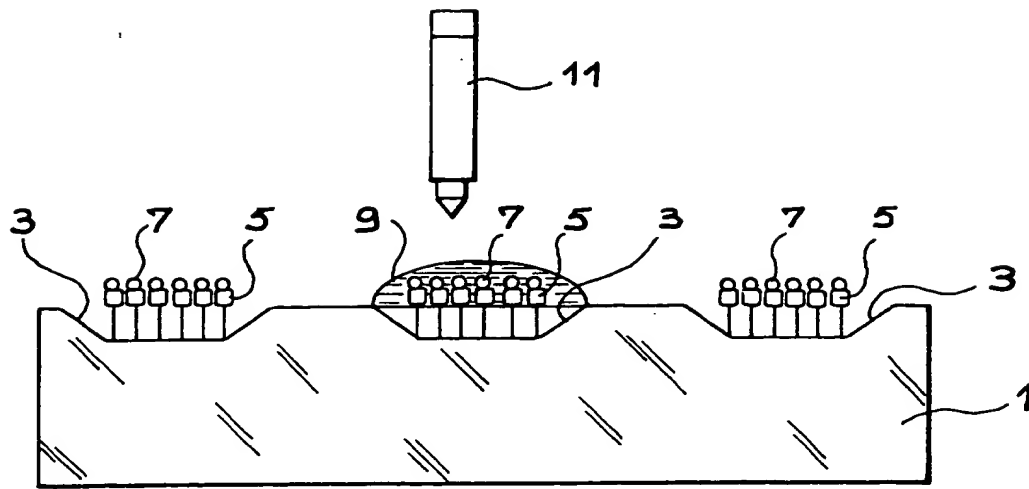


FIG. 1A

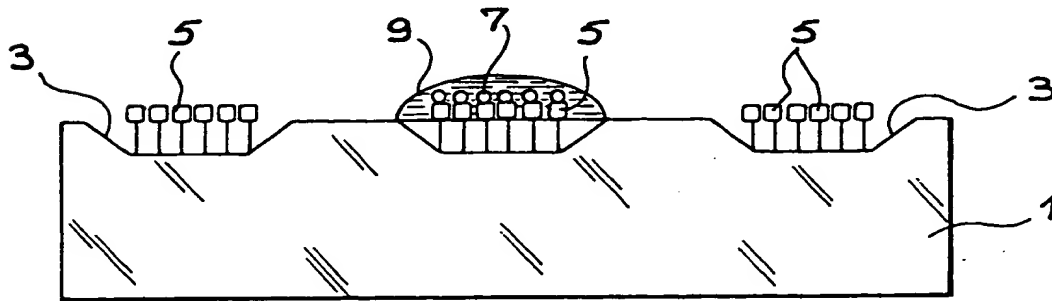


FIG. 1B

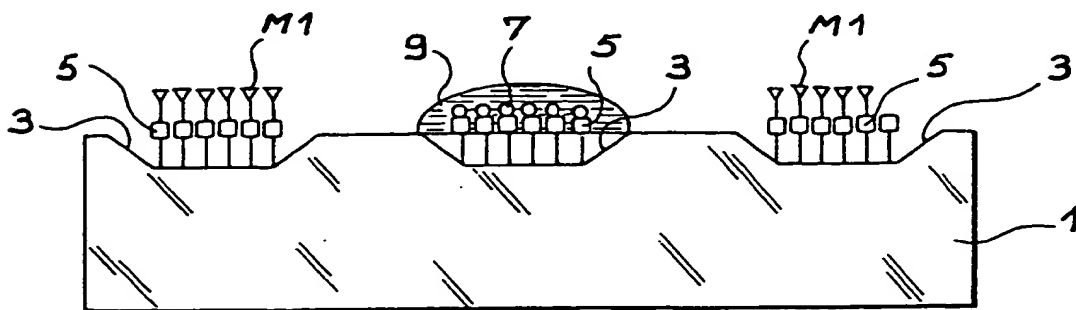
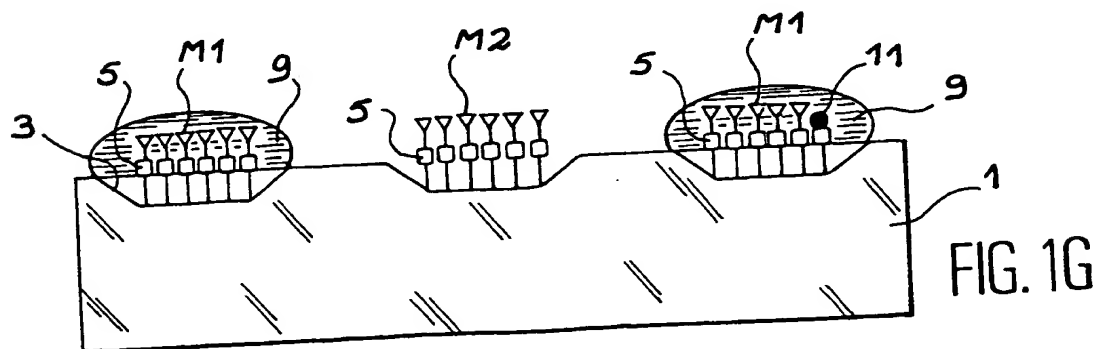
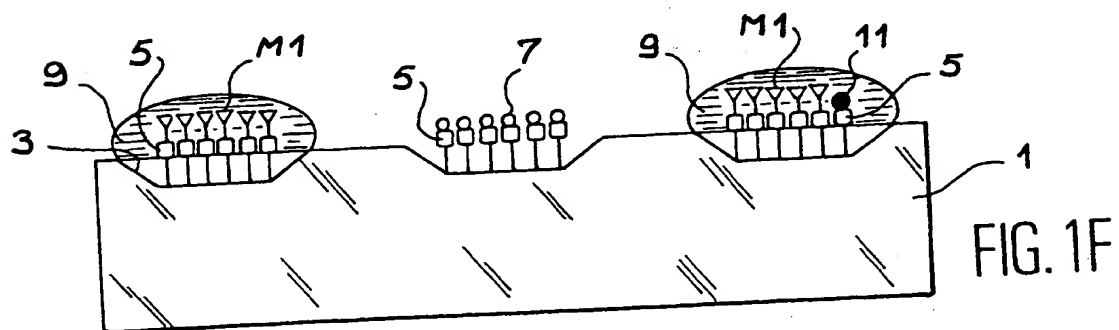
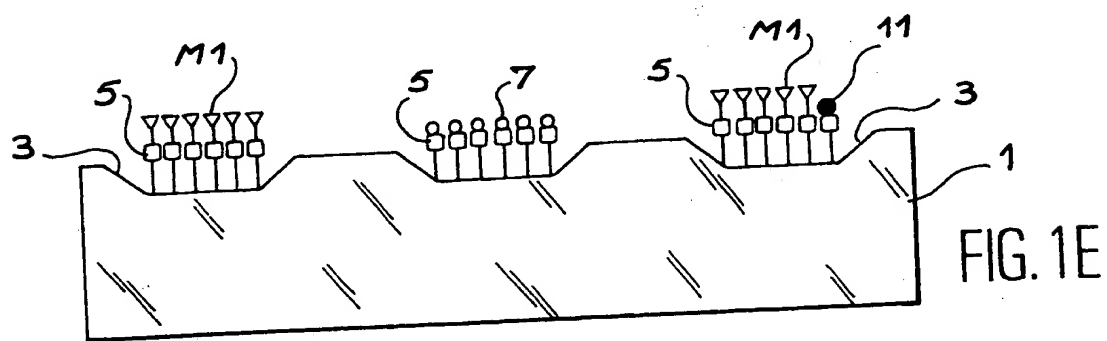
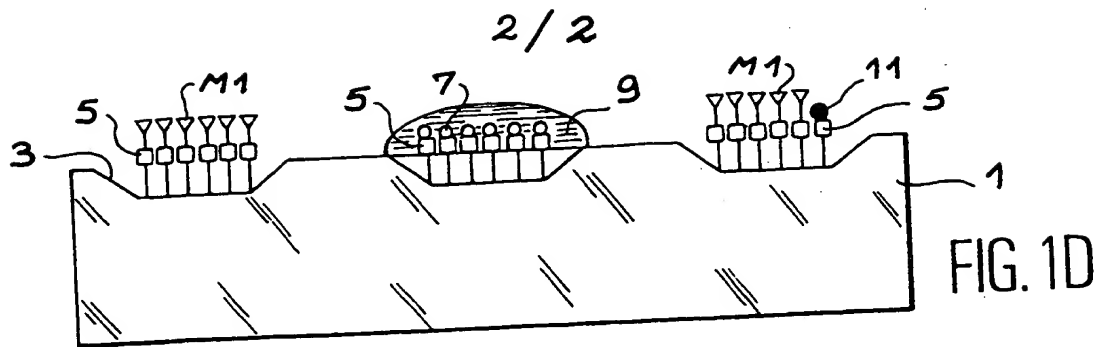


FIG. 1C



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

**This Page Blank (uspto)**